

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Posible valor pronóstico de la presencia
de mutación de BRAF en melanoma
maligno.**

**Possible prognostic value of the presence
of BRAF mutation in malignant
melanoma.**

AUTOR: GONZALO GARCÍA PERALES
DIRECTOR/AS: MARÍA DEL CARMEN GONZÁLEZ VELA
SUSANA ARMESTO ALONSO

SANTANDER, JUNIO DE 2019

INDICE

1. Introducción	1
- Epidemiología.....	1
- Etiología.....	1
- Diagnóstico.....	2
- Formas clínico-patológicas.....	3
- Estadíaje del melanoma.....	6
- Factores pronósticos histológicos.....	7
- Tipos moleculares de melanoma.....	7
- BRAF.....	9
2. Hipótesis y Objetivos.....	10
3. Material y métodos.....	10
- Pacientes.....	10
- Estudio de factores pronósticos morfológicos.....	11
- Estudio molecular.....	11
- Estudio estadístico.....	12
4. Resultados.....	12
- Características de los pacientes.....	12
- Esquemas de tratamiento.....	13
- Características anatomopatológicas.....	14
- Estatus mutacional de BRAF.....	15
5. Discusión.....	18
6. Conclusión.....	21
7. Bibliografía.....	22

RESUMEN

Una gran cantidad de neoplasias se han relacionado con mutaciones genéticas que llevan a la alteración del ciclo celular. En los melanomas, la mutación en el gen BRAF hace que la vía de las MAPK esté sobreactivada, generando así, un crecimiento en las células melanocíticas.

Esta razón, ha llevado al diseño de este estudio retrospectivo en pacientes diagnosticados de melanoma, en los cuales se ha analizado el estado de BRAF, determinando su frecuencia, su repercusión clínica y las características anatomopatológicas.

De los 31 pacientes incluidos 12 (38,7%) presentaban la mutación en BRAF y 19 (61,3%) no la presentaban. Los pacientes BRAF mutados eran diagnosticados a una edad más temprana (56 años), mientras que los no mutados a una mayor (62 años). No se apreciaron diferencias significativas en la supervivencia global desde diagnóstico del tumor primario $p=0,803$. Los BRAF mutados la mediana fue de 52 meses y en lo no mutados de 53. Respecto a la supervivencia desde el diagnóstico de enfermedad metastásica tampoco fue significativa $p=0,608$. Los pacientes con melanomas metastásico portadores de mutación del gen BRAF tenían una mediana de 77 mientras que en los melanomas metastásicos sin la mutación en BRAF la mediana fue de 31. Se relacionó BRAF con una tendencia mayor índice mitótico $p=0,056$ sin ser significativo.

Así pues, podemos concluir que presentar BRAF mutado no implica mayor supervivencia. Aún así debido al tamaño muestral bajo, estos datos hay mirarlos con precaución.

Palabras clave: melanoma, BRAF, supervivencia.

ABSTRACT

A large number of neoplasms have been linked to genetic mutations that lead to the alteration of the cell cycle. In melanomas, the mutation in the BRAF gene causes the MAPK pathway to be overactivated, thus generating growth in the melanocytic cells.

This reason has led to the design of this retrospective study in patients diagnosed with melanoma, in which the BRAF status has been analyzed, determining its frequency, its clinical repercussion and the anatomopathological characteristics.

Of the 31 patients included, 12 (38.7%) presented the mutation in BRAF and 19 (61.3%) did not present it. The mutated BRAF patients were diagnosed at an earlier age (56 years), while the non-mutated patients were diagnosed at an older age (62 years). There were no significant differences in overall survival since diagnosis of the primary tumor $p = 0.803$. The BRAF mutated median was 52 months and in the non-mutated 53. Regarding survival from the diagnosis of metastatic disease, it was also not significant $p = 0.608$. Patients with metastatic melanomas carrying the BRAF mutation had a median of 77, whereas in metastatic melanomas without the BRAF mutation, the median was 31. BRAF was associated with a higher mitotic index tendency $p = 0.056$ without being significant.

To sum up, we can conclude that presenting mutated BRAF does not imply higher survival. Even so, due to the low sample size, these data must be viewed with caution.

Key words: Melanoma, BRAF, survival.

INTRODUCCIÓN

El melanoma es un tumor maligno que se origina a partir de las células melanocíticas que derivan de la cresta neural(1). La mayoría de los melanomas se localizan en la piel (95%) y menos frecuentemente (5%) en mucosas (oral, tubo digestivo, genital), retina o meninges. Un 3% de pacientes desarrollan melanomas ocultos, enfermedad metastásica sin evidencia de tumor primario(2).El melanoma puede desarrollarse sobre una lesión melanocítica benigna preexistente, sobre un nevus displásico o puede originarse de novo(1). El melanoma es la causa más frecuente de mortalidad por cáncer de piel. Se estima que el melanoma maligno produce un 75% de las muertes asociadas al cáncer de piel(3).

EPIDEMIOLOGÍA

En los últimos años ha existido un crecimiento exponencial de los casos de melanoma. La incidencia del melanoma cutáneo sigue en aumento en Europa con notables diferencias geográficas en cuanto a su mortalidad (4). La incidencia en España ajustada por 100.000 habitantes es de 9,7 por cada 100.000 personas, con máxima frecuencia en Marbella y mínima en Zaragoza para el total de población. En el registro nacional de melanoma de la "Academia Española de Dermatología y Venereología" entre el periodo de 1998 y 2011 se observó que en nuestro país el melanoma es más común en las mujeres (57,2%), con una edad media en el momento del diagnóstico de 55 años en las mujeres y 57 años en los hombres (5).A pesar del aumento del número de casos, la mortalidad permanece estable, probablemente en relación con la mejoría diagnóstica y precocidad quirúrgica.

ETIOLOGIA

La etiología del melanoma es multifactorial, incluyendo factores raciales, genéticos y medioambientales. El factor predisponente más importante en la mayoría de los melanomas, con la excepción del melanoma acral y de mucosas, es la exposición excesiva a la luz ultravioleta (LU)(1). La exposición al sol es generalmente aceptada como un factor causante importante(6). Sin embargo, su mecanismo es desconocido, y el papel de la exposición a la luz ultravioleta es complejo y tiene algunas características paradójicas. Por ejemplo, en las personas de piel clara, el grupo que es predominantemente afectado por el melanoma, los tumores son más comunes en áreas que están expuestas al sol de manera

intermitente, como el tronco, los brazos y las piernas, en lugar de áreas que están expuestas crónicamente. Al sol, como la cara(7). Los pacientes con Xeroderma pigmentosum tienen un mayor riesgo de desarrollar melanoma. Existe una mayor incidencia en personas rubias, pelirrojas y de ojos claros (Fototipo I/II). Los pacientes de raza negra tienen una incidencia 10 veces menor que los de raza blanca.

También se conocen otros factores de riesgo como es la presencia de nevus atípicos, antecedente previo de melanoma; la existencia previa de un melanoma incrementa en 70 veces el riesgo de desarrollar un nuevo melanoma, un estado de inmunosupresión, el tratamiento con psoralenos, y los antecedentes de melanoma maligno en un familiar de primer nivel (8,9).

El melanoma puede aparecer a cualquier edad. Aunque cada vez se diagnostican en gente más joven, la mayor frecuencia se concentra en la edad media de la vida. El 41% de los melanomas se diagnostican antes de los 55 años. El melanoma es ligeramente más frecuente en las mujeres, donde predomina en extremidades inferiores y zonas de mayor exposición al sol; y en general, tiene mejor pronóstico que en los varones.

Existe una variante de melanoma hereditario, el cual representa <1% de todos los melanomas.

Se ha relacionado con la mutación de 2 genes: CDKN2A y CDK4, y posiblemente existe otro gen en el cromosoma 1p22 que podría tener relación con el desarrollo de la enfermedad.

DIAGNÓSTICO

El melanoma de la piel generalmente es asintomático, aunque el prurito puede ser una manifestación temprana. El signo clínico más importante es un cambio en el color o tamaño de una lesión pigmentada.

Los principales signos de advertencia clínica son los siguientes: un rápido crecimiento de un nevo preexistente, prurito o dolor en una lesión, desarrollo de una nueva lesión pigmentada durante la vida adulta, irregularidad de los bordes de una lesión pigmentada, así como la heterogeneidad del color dentro de una lesión pigmentada(10).

Estos principios se expresan en los denominados "ABCDE" del melanoma: A, se refiere a asimetría; B, a bordes irregulares; C, se refiere a color heterogéneo; D, diámetro mayor de 6 mm; E, se corresponde con la evolución. El diagnóstico clínico de melanoma se basa en el reconocimiento de estas características clínicas.

Es de vital importancia reconocer los melanomas e intervenir lo más rápidamente posible.

La sospecha diagnóstica del melanoma es fundamentalmente clínica y el diagnóstico debe confirmarse mediante la realización de una biopsia excisional estudiada por un anatomopatólogo(11).

Además del examen clínico, la realización de dermatoscopia bien mediante dispositivos de aumento o mediante el análisis digital computarizado de las lesiones pigmentadas, han aumentado la sensibilidad en el diagnóstico de las lesiones sospechosas de melanoma.

FORMAS CLÍNICO PATOLÓGICAS:

- DE EXTENSIÓN SUPERFICIAL: Es el tipo más frecuente, 70%, se relaciona con exposiciones solares agudas e intermitentes. La localización de las lesiones difiere respecto al sexo, siendo más frecuente en la espalda en varones y en piernas en mujeres. Presenta una fase de crecimiento radial lento y una segunda fase vertical, rápida. Suele manifestarse por cambios en el borde, ulceraciones, fenómenos hemorrágicos. En cuanto a la histología, podemos apreciar melanocitos neoplásicos, redondos, con amplio citoplasma claro, adoptando una disposición en nidos irregulares.



Figura 1, 2 y 3: Melanoma de extensión superficial.

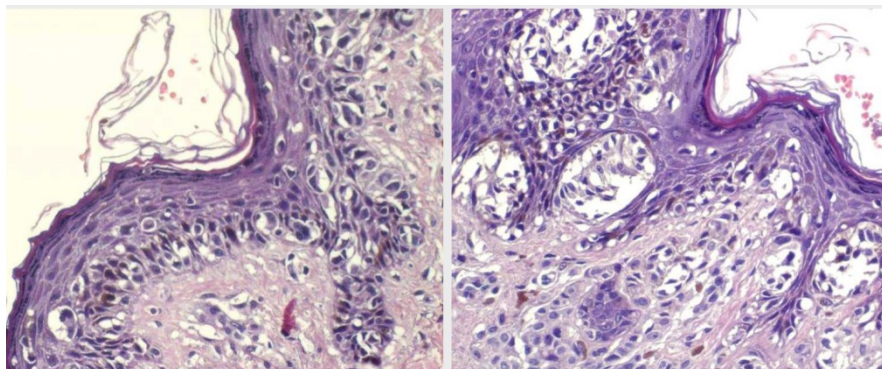


Figura 4: Melanoma de extensión superficial, componente intraepidérmico

- **LÉNTIGO MALIGNO:** Relacionado con la exposición solar crónica por lo que es más frecuente en ancianos, en torno a la séptima década de la vida. Se caracteriza por ser de crecimiento lento. Histológicamente se visualizan melanocitos fusiformes aislados que con el tiempo tienden a agruparse.



Figura 5: Melanoma lentigo maligno.

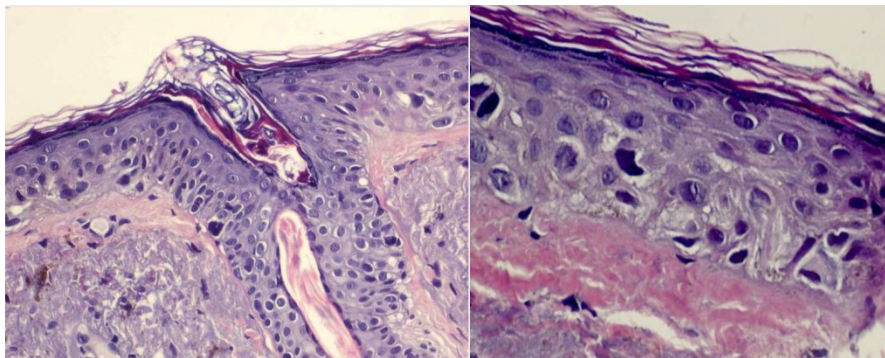


Figura 6 y 7: Histología del melanoma lentigo maligno.

- **MELANOMA NODULAR:** el 15 % de los melanomas corresponden a este tipo, se trata de uno de los subtipos más agresivos, debido a su rápido crecimiento vertical. Es más frecuente en varones y se localiza fundamentalmente en tórax, cabeza y cuello. Desde el punto de vista de la histología, se caracteriza por la presencia de melanocitos atípicos en la unión dermo-epidérmica, los cuales son capaces de romper la membrana basal y penetrar en la dermis.



Figura 8: Melanoma nodular

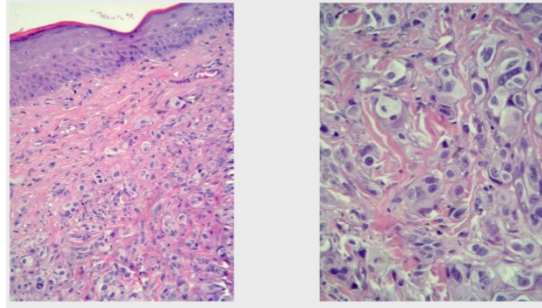


Figura 9: Histología Melanoma Nodular.

- MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL: Representa el 5%. Afecta principalmente a personas de edad avanzada, en torno a los 70 años. La localización más típica de este son palmas, plantas e incluso uña. Desde el punto de vista histológico podemos apreciar, acantosis, hiperqueratosis, proliferación lentiginosa de melanocitos atípicos, así como células tumorales a lo largo de glándulas sudoríparas, nidos tumorales y respuesta estroma.



Figura 10: Melanoma lentigo acral

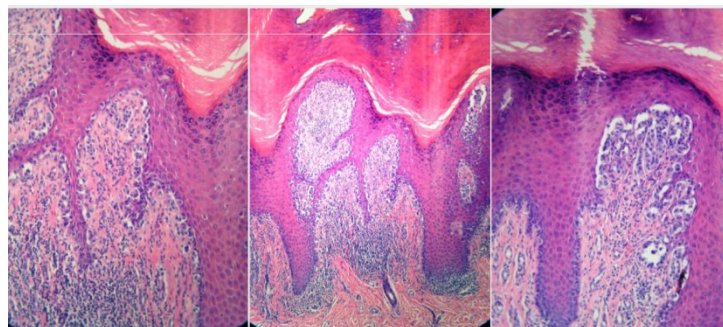


Figura 11: Anatomía patológica del melanoma lentigo acral.

- OCULAR: Es poco frecuente, 1-2%. Genera afectación coroides, cuerpo ciliar y rara vez al iris. Está relacionado con síndromes de afectación multiorgánica: neurofibromatosis tipo 1. Síndrome de nevus displásico, Nevus de Ota. No parece guardar relación con la

exposición solar. La mortalidad es elevada por la tendencia a la diseminación, especialmente hepática.

- MUCOSAS: Son relativamente infrecuentes, suponiendo del 0.5-1%. Las mucosas que con más frecuencia se afectan por el melanoma son las siguientes: oral, nasofaringe, laringe, vagina, ano. Son variantes de mal pronóstico.
- MELANOMA DESMOPLÁSICO: Es una variante clínico-patológica poco frecuente, que se presenta clínicamente como una lesión banal, que posteriormente desarrolla un tumor profundo, fibroso, con predominio de células fusiformes, caracterizado por una tendencia a las recidivas locales múltiples y con gran capacidad de infiltración local y desarrollo de metástasis.

ESTADIAJE DEL MELANOMA

1. Exploración física.
2. Mapeo de ganglios linfáticos y biopsia de ganglio linfático centinela. El cirujano extrae solo aquellos ganglios marcados con la sustancia radiactiva y un patólogo observa una muestra de tejido al microscopio para ver si hay células cancerosas.
3. TAC (tomografía axial computarizada): procedimiento mediante el cual se toma una serie de imágenes detalladas del interior del cuerpo, como el cuello, el pecho y el abdomen, desde ángulos diferentes.
4. Exploración con PET (exploración con tomografía por emisión de positrones): es una prueba diagnóstica extraordinariamente sensible cuando existe sospecha de enfermedad metastásica.
5. Imágenes por resonancia magnética con gadolinio (RNM).
6. Análisis de la sangre: la lactato-deshidrogenasa (LDH) se relaciona con la carga tumoral en los estadios avanzados.

El estadiaje del Melanoma se basa en la nueva actualización de la AJCC(12).

FACTORES PRONÓSTICOS HISTOLÓGICOS

Además de la estadificación tumoral, hay una serie de parámetros histológicos con valor pronóstico en melanoma que deben incluirse en los informes anatomopatológicos (13).

ESPESOR DEL TUMOR El índice Breslow: Es la variable pronóstica más importante, es independiente de los demás factores y determina el manejo a realizar con el paciente. Mide la profundidad en milímetros desde el estrato granuloso hasta la célula melánica tumoral localizada más profunda.

NIVEL DE CLARK: Es menos utilizado, mide la profundidad del tumor según el nivel dermoepidérmico afectado. No era un indicador pronóstico independiente en el análisis multivariado.

ULCERACIÓN: La presencia de ulceración se relaciona con una mayor mortalidad.

MITOSIS: El aumento de la tasa mitótica se correlacionó significativamente con el aumento del grosor del tumor primario y con el pronóstico.

INFILTRACIÓN LINFOCITARIA TUMORAL: un infiltrado linfocitario denso, en el seno del melanoma, confiere un mejor pronóstico.

REGRESIÓN: Aparece el 20% de los casos y tiene peor pronóstico.

INVASION VASCULAR/PERINEURAL: Su presencia produce mayor recaída local y menor supervivencia.

SATELITOSIS MICROSCÓPICA: son nidos de células tumorales de 0.05 mm, separados del tumor primario. Se correlacionan con una peor supervivencia.

TIPOS MOLECULARES DE MELANOMA

Los factores pronósticos más importantes en el melanoma cutáneo localizado son el espesor de Breslow y la ulceración (14). Sin embargo, existen grandes diferencias en el comportamiento de pacientes cuyos melanomas son similares respecto a estos factores.

Los avances en el conocimiento de las alteraciones genéticas del melanoma han demostrado que hay alteraciones genéticas identificadas en melanomas en diferentes sitios y con diferentes niveles de exposición al sol indicando que existen distintas vías genéticas en el desarrollo del melanoma. Así se han propuesto una clasificación de los melanomas atendiendo a factores epidemiológicos y alteraciones genéticas(15).

Curtin y colaboradores demostraron que había muchas diferencias genéticas entre los melanomas en la piel que estaban relativamente o absolutamente protegidos del sol (melanomas acrales y de mucosas) y los melanomas en la piel con diversos grados de exposición al sol (15). Demostrando distintos patrones de alteraciones genéticas en los cuatro grupos de melanomas primarios:

- 1- Melanomas desarrollados sobre piel sin daño solar crónico (o melanoma relacionado con daño solar intermitente); incluiría al Melanoma de extensión superficial y parte de los melanomas nodulares.
- 2- Melanomas sobre piel con daño solar crónico, que correspondería fundamentalmente al melanoma sobre lentigo maligno y una parte de los melanomas nodulares.
- 3- Melanomas acrales.
- 4- Melanomas mucosos

Las mutaciones BRAF son comunes en los melanomas que surgen en áreas expuestas al sol de manera intermitente y son raras en los melanomas en la piel que está expuesta crónicamente al sol o en la piel acral y las membranas mucosas, que rara vez o nunca están expuestas al sol. (16). Además, varios estudios han demostrado que los melanomas de las palmas y plantas de los pies y las membranas mucosas tienen patrones distintivos de aberraciones cromosómicas en comparación con los de otros sitios(17).

La mayoría de los melanomas, no incluidos en los que aparecen en piel sin daño solar crónico, no presentaban mutaciones en estos genes, pero sí amplificaciones de los genes CDK4 y ciclina D1, alteraciones de NF1, aberraciones genéticas de c-Kit. Mutaciones del promotor TERT son frecuentes en estadios incipientes de melanoma. Estudios experimentales han mostrado que los reguladores del ciclo celular p16 y p14ARF, ambos productos derivados del locus CDKN2) están frecuentemente inactivados en melanomas que aparecen en piel con daño actínico crónico. Las mutaciones en el gen KIT se encuentran frecuentemente en melanomas acrales, mucosos y con daño solar crónico mientras que los melanomas uveales presentan mutaciones en proteínas GNAQ y GNA11 (18).

El tratamiento del melanoma metastásico se modificó radicalmente con la introducción de los inhibidores de BRAF, un oncogén mutado en el 40-50% de los pacientes. Otra área de avance fue el uso de la inmunoterapia y, específicamente, los inhibidores del punto de control inmunitario. Los anticuerpos monoclonales dirigidos a las moléculas

inmunomoduladoras, como el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y el receptor 1 de muerte programada (PD-1), representan un avance adicional.

BRAF

Una de las alteraciones moleculares presentes en un mayor número de melanomas implica a la vía de señalización intracelular MAPK (mitogen-activated proteinkinase), también conocida como ERK (extracellular-relatedkinase). Esta vía de señalización intra celular incluye cuatro cinasas: RAS, RAF, MEK y ERK. En los melanomas, se han detectado mutaciones en la cinasa N-RAS en el 15% de los casos, mientras que B-RAF se encuentra mutada en el 50% de los casos(19). Ambas mutaciones son excluyentes entre sí. Los nevus melanocíticos comparten con los melanomas una frecuencia similar de mutaciones en B-RAF(20).

El gen BRAF, localizado en el brazo largo del cromosoma 7, codifica para una serin/treonin kinasa que activa la cascada RAS/RAF/MEK/ERK implicada en la transducción de señales mitogénicas desde los receptores de membrana hasta el núcleo. En los melanocitos, la mutación de BRAF y por tanto el aumento de actividad de la vía MAPK lleva a la ausencia de apoptosis e induce el avance en el ciclo celular (21).

La mutación más prevalente es la que tiene lugar por la sustitución T1799A en el exón 15, la cual lleva a un cambio del codón GTG (valina) por GAG (ácido glutámico) en la posición 600 (V600E). Este cambio origina una alteración en el propio dominio cinasa que conlleva una activación permanente de B-RAF y, por extensión, de la vía de la MAPK(22). La segunda en frecuencia sería la (V600K) y luego otras mucho menos frecuentes como la (V600D) y la (V600E2). Se conocen al menos otras 70 mutaciones en esta misma cinasa que conducen a una activación de BRAF de menor intensidad que la ocasionada por V600E, por lo que reciben el nombre de mutaciones de baja actividad (23).

La presencia de mutación de BRAF supone una diana terapéutica sobre la que actuar. Así pues, existen fármacos como el Dabrafenib y el Vemurafenib que actúan sobre esta diana (24).

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis del presente trabajo es determinar el valor pronóstico de la presencia de mutación de BRAF en el melanoma maligno y su posible relación con los parámetros clínico-patológicos.

OBJETIVOS:

- Estudio retrospectivo clínico patológico de una serie de pacientes con melanoma maligno metastásico tratados en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.
- Determinación de la mutación BRAF mediante estudio de Patología Molecular.
- Analizar la supervivencia global (SG) desde el diagnóstico del tumor primario hasta la muerte teniendo en cuenta el estado mutacional de BRAF.
- Analizar la supervivencia desde el diagnóstico de la metástasis(SMTX) hasta la fecha de óbitos del paciente o hasta el último día de seguimiento en consulta; teniendo en cuenta el estado mutacional de BRAF.
- Determinar el periodo libre de enfermedad (PLE) desde el diagnóstico del melanoma primario hasta la aparición de la enfermedad metastásica o recaída tumoral.

MATERIAL Y METODO:

PACIENTES

- Se incluyen en el estudio aquellos pacientes que cumplan los siguientes criterios:
- Confirmación histológica de melanoma maligno de piel (excluidos melanomas de mucosa o viscerales)
- Estudio de mutación de BRAF mediante patología molecular en melanoma primario o metástasis.
- Afectación metastásica durante la evolución de la enfermedad
- Seguimiento en nuestro centro hasta el fallecimiento o hasta el último día de consulta en nuestro centro.

Se recogieron de la historia clínica de los pacientes los siguientes datos clínicos: edad, sexo, localización, presencia o no metástasis en ganglios regionales y a distancia, tratamiento inicial, seguimiento, recurrencia, metástasis, y SG, SMTX, PLE.

Entendemos por supervivencia global (SG) al tiempo comprendido entre el diagnóstico inicial del melanoma hasta la fecha de óxitus o hasta el último día de seguimiento en consulta.

Se definió como periodo libre de enfermedad (PLE) al tiempo transcurrido desde el diagnóstico del melanoma hasta que se produce una metástasis de este.

La supervivencia post metástasis (SMTX) se entiende como el tiempo transcurrido desde que un melanoma es o se convierte en M1 hasta la fecha de óxitus del paciente o hasta el último día de seguimiento en consulta.

ESTUDIO DE FACTORES PRONÓSTICO-MORFOLÓGICOS

En los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina se estudiaron los siguientes parámetros:

- Espesor de invasión: medido en mm desde la capa granulosa hasta la célula tumoral más profunda; si existe ulceración se mide a partir de la misma.
- Índice mitótico (mitosis/10 CGA).
- Ulceración.
- Regresión.
- Satelitis microscópica.
- Presencia de invasión vascular y/o perineural.
- Infiltración Linfoide intratumoral (TIL).

ESTUDIO MOLECULAR

El estudio mutacional del gen BRAF se realizó mediante el método Idylla™ BRAF Mutation Test (25). El Idylla™ BRAF Mutation Test, realizado con el sistema Idylla™ de Biocartis, es una prueba de diagnóstico in vitro para la detección cualitativa de las mutaciones V600E/E2/D y V600K/R/M en el codón 600 del gen BRAF. El Idylla™ BRAF Mutation Test utiliza ADN liberado de secciones de tejido fijado en formalina e incluido en parafina (FFPE) de células tumorales de melanoma humano. El test es un PCR en tiempo real que abarca desde la muestra hasta el resultado. Puede detectar mutaciones en BRAF V600E, E2, D, K, R y M, con una sensibilidad analítica del 1 % de mutación con fondo de tipo salvaje en muestras de FFPE.

ESTUDIO ESTADISTICO

Se realizó estudio estadístico utilizando el programa SPSS V 12.0.1 para Windows. En la interpretación de los resultados se definió como significativo el valor de p bilateral inferior a 0,05.

Para la realización del estudio estadístico, se dividieron los pacientes en dos grupos en función del estado mutacional de BRAF. El método de Kaplan-Meier se utilizó para estimar la distribución de eventos, tanto para la supervivencia global desde el diagnóstico del melanoma primario, como para la supervivencia tras el diagnóstico de metástasis. Se realizó también el método de Regresión de COX.

RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

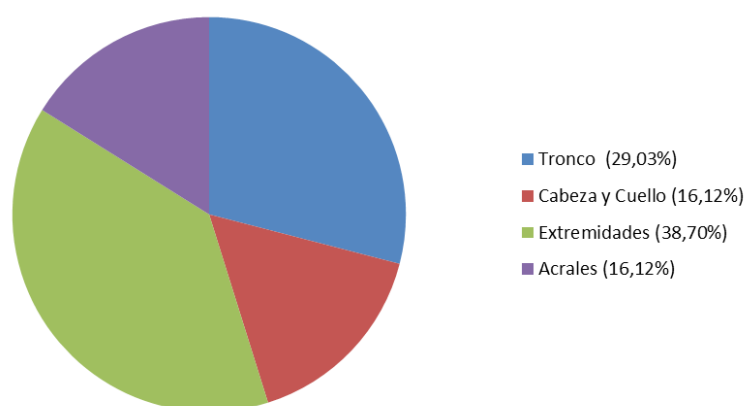
El estudio fue realizado en 31 pacientes diagnosticados de melanoma maligno con confirmación histológica y tratados en el servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. El diagnóstico inicial de melanoma primario se llevó a cabo entre los años 2006-2017.

La media de edad de los pacientes al diagnóstico del tumor primario era de 59,81 años. Un 51,6 % de los pacientes eran hombres y el 48,4 % eran mujeres. La media de IMC y LDH al diagnóstico eran 27,30 y 253,21 respectivamente. La media de la SG era de 53,68 meses y de la STMX era de 17,77 meses. Tabla 1.

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES				
	HOMBRES	%	MUJERES	%
SEXO	16	51,6%	15	48,4%
	MEDIANA		MEDIA	SD
EDAD	62		59,81	16,9
IMC	28,8		27,30	4,07
LDH	197		253,21	168,42
SG	32		53,68	81,83
STMX	23		21,48	17,77

Los melanomas primarios estaban localizados en tronco (29,03%), cabeza y cuello (16,12%), extremidades (38,70%) y acral (16,12%). Figura 12.

LOCALIZACIONES



Del total de 31 pacientes, al diagnóstico de la enfermedad, 5 pacientes presentaban estadio I, 6 se encontraban en estadio II, 14 eran estadio III y 6 en estadio IV.

Los pacientes que presentaron metástasis al diagnóstico fueron un total de 6 (2 tenían metástasis cutáneas, 1 paciente con metástasis pulmonar, 1 paciente tuvo metástasis óseas, otro presentó metástasis cutáneas y pulmonares y el otro mostraba metástasis hepáticas y pulmonares).

Del total de 25 pacientes que no presentaron metástasis al diagnóstico inicial 18 desarrollaron metástasis posteriormente. Nueve pacientes presentaron metástasis cutáneas, 2 cerebrales, 2 hepáticas, 2 pulmonares, 2 pulmonares y hepáticas. Por último, 1 presentó metástasis pulmonares y óseas. Siete de los 31 de los pacientes no realizaron metástasis hasta el último día de seguimiento.

ESQUEMAS DE TRATAMIENTO

Un total de 10 pacientes (32,3%) recibieron adyuvancia terapéutica (interferón o inmunoterapia) mientras que 20 (64,5%) no se les aplicó adyuvancia. La inmunoterapia empleada consistió en inhibidores de PD-1 (Nivolumab y Pembrolizumab), y CTLA-4 (Ipilimumab).

Habían recibido tratamiento radioterápico solamente 16 pacientes (51,6%). La quimioterapia dirigida fue con inhibidores de BRAF (Dabrafenib y Vemurafenib) + un inhibidor de MEK (Trametinib o Cobimetinib). Siete pacientes (22,58%) fueron tratados con inhibidores de BRAF como tratamiento inicial.

El otro esquema quimioterápico consistió en agentes alquilantes; 1 paciente se trató de inicio con temozolomida, 2 pacientes recibieron fotemustina de entrada, y 1 recibió cisplatino como tratamiento de primera línea inicial. Un 35,48% de los pacientes no fueron subsidiarios de recibir ninguno de estos tratamientos.

CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS

Los siguientes aspectos anatomopatológicos fueron valorados al diagnóstico del melanoma: índice de Breslow, ulceración, índice mitótico, invasión intravascular, regresión, satelitosis, TILS, así como la presencia de metástasis en ganglio centinela. Tabla 2.

FACTORES ANATOMOPATOLÓGICOS				
	POSITIVO/SI	%	NEGATIVO/NO	%
TILS	8	25,8	23	74,2
BRAF	12	38,7	19	61,3
ULCERACIÓN	19	61,3	12	38,7
INV.	4	12,9	27	87,1
INTRAVASCULAR				
REGRESIÓN	1	3,2	28	90,3
SATELITOSIS	2	6,5	27	87,1
GANGLIO	20	64,5	8	25,8
CENTINELA				
	MEDIANA	MEDIA	SD	
BRESLOW	3	4,3	2,84	
ÍNDICE MITÓTICO	10	12,28	18,76	

De todos los parámetros anatomopatológicos estudiados, solamente la ulceración mostró una relación estadísticamente significativa con la supervivencia global y libre de metástasis. Diecinueve (61,3%) pacientes presentaron ulceración y 12 (38,7%) no la presentaron. Los pacientes con ulceración presentaron una supervivencia global de 32,89 meses siendo de 22,64 su desviación estándar. Los que carecían de ulceración tuvieron una supervivencia global de 86,58 (SD: 124,48; $p=0,005$).

De la misma forma, los pacientes con ulceración, presentaron un periodo libre de enfermedad de 16,90 meses SD=12,67. Por el contra, los pacientes sin ulceración, tuvieron un periodo libre de enfermedad de 75,22 meses (SD=122,69; $p=0,005$).

De los 28 casos que se estudió el ganglio centinela, 20 fueron positivo (64,5%) mientras que en 8 fue negativo (25,8%). En tres de los pacientes no se hizo estudio de ganglio centinela. Los pacientes que presentaron al diagnóstico GC positivo tuvieron una SG de 32,65 meses SD=18,53 mientras que en los que era negativo fue de 121,25 y SD=143,34 siendo estos resultados estadísticamente significativos $p=0,0001$. Los pacientes que tenían metástasis de ganglio centinela, tuvieron una media de SMTX de 14 meses SD=8,25 y los que no la presentaban obtuvieron la media de 112 meses (SD=139,51; $p=0,0001$).

Así pues, estos datos parecen conducir a que los pacientes con ganglio centinela negativo al diagnóstico tienen una mayor SG y SMTX.

ESTATUS MUTACIONAL DE BRAF

De los 31 pacientes analizados el estatus mutacional de BRAF, había 12 pacientes con mutación de BRAF y 19 pacientes con melanomas wild/type.

Se observó que 5 de las 15 mujeres presentaban mutación de BRAF frente a 7 de los 16 varones. Tabla 3.

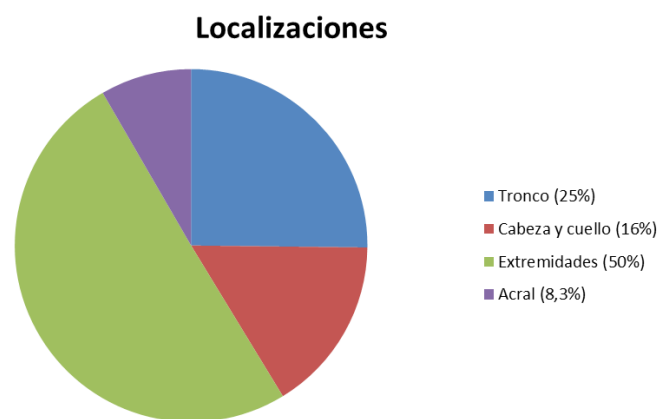
BRAF mutado *Sexo tabulación cruzada					
			Sexo		Total
			Hombre	Mujer	
BRAF mutado	Negativo	Recuento	9	10	19
		% dentro de BRAF mutado	47,4%	52,6%	100,0%
	Positivo	Recuento	7	5	12
		% dentro de BRAF mutado	58,3%	41,7%	100,0%
Total		Recuento	16	15	31
		% dentro de BRAF mutado	51,6%	48,4%	100,0%

También se observó una mayor tendencia a tener mutación de BRAF en los pacientes más jóvenes (55,75 versus 62,37) Tabla 4.

BRAF mutado		N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
Edad	Negativo	19	62,37	16,961	3,891
	Positivo	12	55,75	16,918	4,884

En cuanto al índice mitótico, la media de mitosis por campo en los melanomas BRAF mutados fue de 18,58, SD=29,13 y de 8,30 mitosis/campo en los no mutados. Hay una cierta tendencia a tener mayor índice mitótico los tumores con mutación de BRAF (SD=4,95; P= 0,056)

Del total de 31 pacientes incluidos en este estudio, 12 fueron BRAF mutados obteniéndose un total de 3 melanomas cuyo origen se encontraba en tronco, 6 estaban en las extremidades, siendo este grupo el mayoritario. Un total de 2 melanomas fueron hallados en cabeza y cuello, y solo 1 melanoma fue acral. Figura 13.



La figura 14 muestra los datos de la supervivencia global desde el diagnóstico inicial del melanoma primario. Los pacientes con melanomas con mutación del gen BRAF presentaban una mediana de 52 meses. Por otra parte, el grupo de pacientes con melanomas no mutados obtuvo una mediana de 53 meses. (HR 0,88; IC 95 % (0,30-2,53) p=0,803. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.

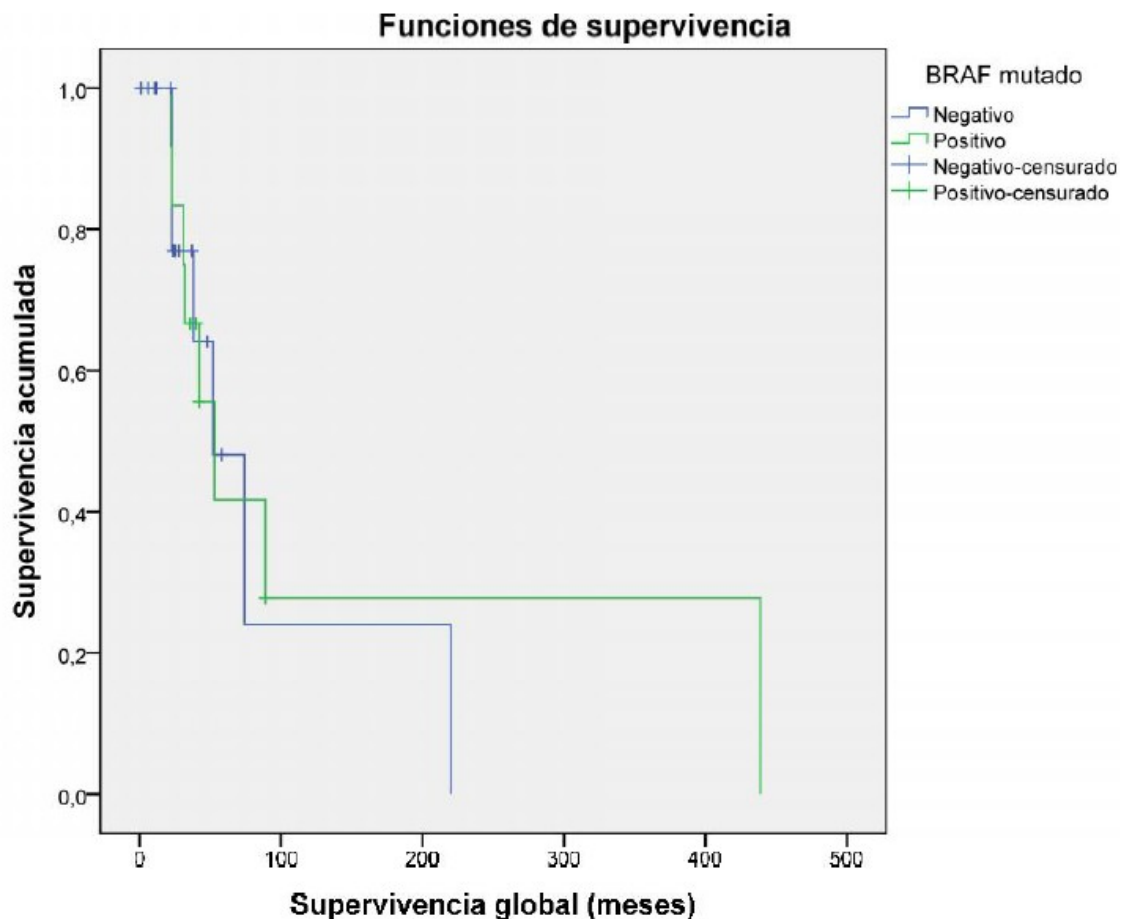


Figura 14. Supervivencia global desde el diagnóstico del melanoma primario hasta la muerte.

Por otro lado, respecto a la supervivencia desde el diagnóstico de enfermedad metastásica, los pacientes con melanomas metastásico, portadores de mutación del gen BRAF tenían una mediana de 77 mientras que en los melanomas metastásicos sin la mutación en BRAF la mediana fue de 31. (HR 0,65; IC 95% (0,12-3,56); $p=0,608$). Figura 15. Se observa una mayor supervivencia desde el diagnóstico de metástasis en los melanomas metastásicos portadores de la mutación del gen BRAF. Aunque las diferencias no alcanzan significación estadística debido al escaso tamaño muestral.

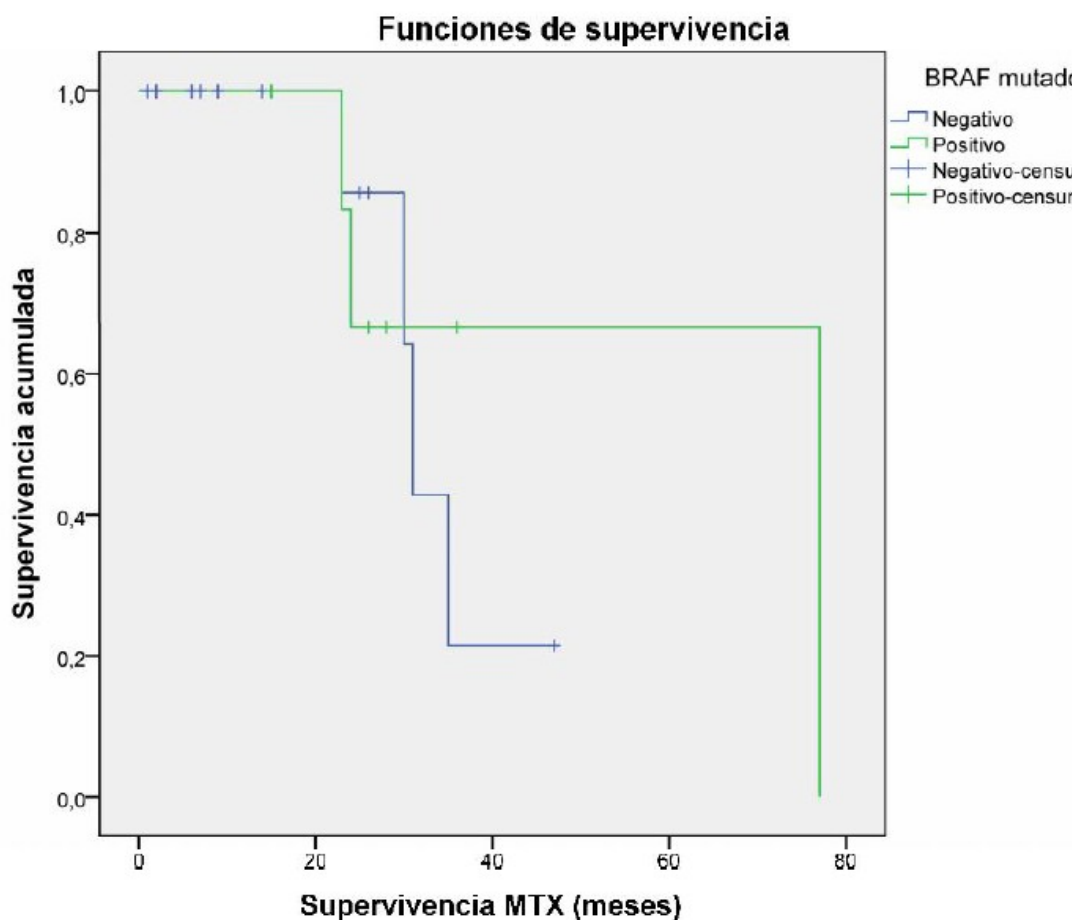


Figura 15. Supervivencia desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica hasta la muerte.

DISCUSION

El tratamiento del melanoma metastásico se modificó radicalmente con la introducción de los inhibidores de BRAF, un oncogén mutado en el 40-50% de los pacientes. Otra área de avance fue el uso de la inmunoterapia y, específicamente, los inhibidores del punto de control inmunitario (26).

Los ensayos clínicos han demostrado que el tratamiento de pacientes con melanoma maligno con inhibidores de BRAF se asocia con una mejor tasa de respuesta, supervivencia libre de progresión y supervivencia general en comparación con la quimioterapia convencional (27). La combinación de BRAFi con MEKi se propuso como una estrategia en pacientes con MM para retrasar o incluso prevenir la aparición de resistencia, sin aumentar el riesgo de desarrollar cánceres secundarios (28).

Nuestros resultados mostraron una frecuencia de melanoma con mutación de BRAF del 38,7%. Estos datos son un poco más bajos que los resultados publicados en la literatura(29,30). Esto puede ser debido a que en nuestra serie, un 32,24% de los melanomas primarios estaban localizados en cabeza- cuello y zona acral; localizaciones donde es poco frecuente la aparición de mutaciones de BRAF (31). En nuestra serie, los casos que presentaban mayor frecuencia de mutación de BRAF, eran los situados en tronco seguidos de los localizados en extremidades. La tendencia es que las mutaciones del BRAF en la población caucásica y asiática ocurran en áreas del cuerpo con exposición solar intermitente (32).

Las características clínico-patológicas de los pacientes afectos de melanoma maligno portadores de la mutación en el oncogén BRAF comparado con los BRAF no mutados han sido analizadas en muchos estudios (29, 30, 33).

En nuestro trabajo observamos que los pacientes con melanoma portadores de la mutación de BRAF presentaban unas características clínicas diferentes que los pacientes con melanoma no portador de mutación de BRAF. Así observamos que la edad más joven al diagnóstico es más frecuente en pacientes con mutación de BRAF. Diferentes grupos de investigación han confirmado esta diferencia en la edad media al diagnóstico, entre los pacientes afectos de melanoma BRAF mutado y BRAF no mutado (34).

También comprobamos en el estudio estadístico que la mutación de BRAF era más frecuente en hombres que en mujeres. Estos hallazgos coinciden con otros observados en la literatura (35).

No observamos relación entre la presencia de mutación de BRAF y los otros parámetros estudiados, salvo con el índice mitótico. Reconociéndose un mayor índice mitótico en los pacientes con mutación de BRAF que en los tumores no portadores de mutación. Estos hallazgos son los que cabría esperar ya que el gen BRAF codifica para una serin/treonin kinasa que activa la cascada RAS/RAF/MEK/ERK implicada en la transducción de señales mitogénicas desde los receptores de membrana hasta el núcleo (36,37).

En cuanto al análisis de SG desde el diagnóstico del melanoma primario, no observamos diferencias significativas entre los pacientes con melanoma portadores de mutación de BRAF frente al grupo de los no mutados. Los resultados descritos en la literatura son contradictorios. En varios estudios, la SG desde el diagnóstico del melanoma primario, no mostró diferencias entre los pacientes con BRAF mutado y no mutado (29,33).

Con respecto al estudio de la supervivencia tras el diagnóstico de la enfermedad metastásica, observamos que la mediana de supervivencia era mayor en el grupo de pacientes BRAF mutado frente al grupo de BRAF no mutado. Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, debido fundamentalmente al escaso tamaño muestral. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por otros estudios (37). Por el contrario Long y col. demostraron que los pacientes con mutación del gen BRAF y nunca tratados con inhibidores de BRAF comparado con el grupo de pacientes con BRAF no mutado presentan una peor supervivencia global tras el diagnóstico de la enfermedad metastásica (38).

Estos hallazgos observados en nuestra serie pueden ser debidos a los diferentes tratamientos recibidos por los pacientes con melanoma metastásico.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio sugieren que los pacientes afectos de melanoma metastásico portadores de la mutación del gen BRAF presentan unas características clínico-patológicas distintas a los pacientes afectos de melanoma metastásico, no portadores de dicha mutación.

- Los pacientes afectos de melanoma maligno portadores de la mutación en el gen BRAF respecto a los que no presentan dicha mutación debutan con el tumor primario a una edad más temprana.
- Parece apreciarse una mayor tendencia de la mutación del gen BRAF en varones con melanoma maligno que en mujeres, siendo no estadísticamente significativa.
- Los pacientes con melanoma maligno mutación de BRAF tienen un mayor índice mitótico que en los pacientes no portadores de mutación BRAF.
- La supervivencia global desde el diagnóstico del melanoma primario no mostraba diferencias entre el grupo de pacientes portadores de la mutación de BRAF comparado con los pacientes BRAF no mutados.
- La supervivencia global desde el diagnóstico de la enfermedad metastásica es mayor para los pacientes con mutación de BRAF comparado con los BRAF no mutados aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

BIBLIOGRAFIA

1. Hosler A, Patterson JW. Malignant melanocytic lesions. Weedon's Skin Pathology. Fourth edition 2016.
2. Noelia Martínez Jáñez. Melanoma. SEOM 2017.
3. Jerant AF, Johnson JT, Sheridan CD, Caffrey TJ. Early detection and treatment of skin cancer. Am Fam Physician. 2000 Jul 15;62(2):357-68, 375-6, 381-2.
4. Arnold M, Holterhues C, Hollestein LM, Coebergh JW, Nijsten T, Pukkala E, et al. Trends in incidence and predictions of cutaneous melanoma across Europe up to 2015. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2014;28:1170---8.
5. Incidencia y mortalidad del cáncer cutáneo en España: revisión sistemática y metaanálisis. Tejera-Vaquero, M.A. Descalzo-Gallego, M.M. Otero-Rivas, C. Posada-García, L. Rodríguez-Pazos, I. Pastushenko, R. Marcos-Gragera, I. García-Doval, Marks R. Epidemiology of melanoma. Clin Exp Dermatol 2000;25:459-63.
7. Whitman DC, Whitman CA, Green AC. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. Cancer Causes Control 2001;12:69-82
8. Manola J, et al., Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. J Clin Oncol, 2000. 18(22): p. 3782-93.
9. Gilchrest BA, et al., The Pathogenesis of Melanoma Induced by Ultraviolet Radiation. N Engl J Med, 1999. 340: p. 1341-1348.
10. Calderón MB, Martín RL. Factores de riesgo y detección temprana del melanoma maligno en pacientes con nevus melanocíticos. Más dermatología. 2011;(14):5-13.
11. Calderón MB, Martín RL. Factores de riesgo y detección temprana del melanoma maligno en pacientes con nevus melanocíticos. Más dermatología. 2011;(14):5-13.
12. Long G V., Ross MI, Flaherty KT, Thompson JF, Scolyer RA, Eggermont AMM, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin. 2017;67(6):472-92.
13. J. Eduardo Calonje, Thomas Brenn, Alexander Lazar, Phillip McKee. Melanoma, Alex Lazar and Boris Bastian. McKee's pathology of the skin. Vol 12 -. 4th ed 2012

14. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*. 2001;19:3622–34.
15. Curtin JA, et al., Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.*, 2005. 353(20): p. 2135-7.
16. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1878-90).
17. Bastian BC, Kashani-Sabet M, Hamm H, et al. Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Res* 2000;60:1968-73.
18. Mutaciones somáticas frecuentes de GNAQ en el melanoma uveal y el naevi azul. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, Bastian BC *Naturaleza*. 2009 29 de enero; 457 (7229): 599-602.
19. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res*. 2003;9:6483–8)
20. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*. 2003;33:19–20.
21. Michaloglou C, et al., BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human nevi. *Nature*, 2005. 436(7051): p. 720-4.
22. Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nature Rev Cancer*. 2004;4:937–47)
23. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004;116:855–67.
24. A. Berrocal, A. Arance, E Espinosa, A. G. Castaño, M. G. Cao, J. L. G. Larriba, J. A. L. Martín, I. Márquez, A. Soria, S. M. Algarra. SEOM guidelines for the management of Malignant Melanoma. *Clin Transl Oncol* 2015; 17:1030–1035
25. Garnett M., Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. 2004. *Cancer Cell*, 6: 313–319).
26. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C y otros, análisis agrupados de datos de supervivencia a largo plazo de ensayos de fase II y fase III de ipilimumab en melanoma no resecable o

metastásico . J Clin Oncol 2015; 33 : 1889–1894.

27.Sosman JA , Kim KB , Schuchter L y otros , Survival in BRAF V600-mutant melanoma avanzado tratado con vemurafenib . N Engl J Med 2012; 366 : 707–714

28.Flaherty KT , Robert C , Hersey P et al. , Mejora la supervivencia con inhibición de MEK en melanoma mutado por BRAF . N Engl J Med 2012; 367 : 107–114.

29.Chang DZ, et al., Clinical significance of BRAF mutations in metastatic melanoma. Journal of Translational Medicine, 2004. 2(1): p. 46.

30. Ugurel S, et al., B-RAF and N-RAS mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis. PLoS One., 2007. 2(2): p. e236.

31.Thomas NE, et al., RAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. Melanoma Res. 2006. 16(2): p. 97-103.

32.Flaherty, Mc Arthur. BRAF a target in melanoma. Implications for solid tumor drug development. Cancer. 2010; 116(21):4902-4913.

33. Houben R, et al., Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis. J Carcinog, 2004. 3(1): p. 6.

34.Long GV, et al., Prognostic and Clinicopathologic Associations of Oncogenic BRAF in Metastatic Melanoma. Journal of Clinical Oncology, 2011. 29(10): p. 1239-46.

35. Ponti G, Tomasi A, Pellacani G. Overwhelming response to Dabrafenib in a patient with double BRAF mutation (V600E y V600M) metastatic malignant Melanoma. J Hematol Oncol.2012;5:60.doi:10.1186/1756-8722-5-60.

36. Michaloglou C, et al., BRAF V600E-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. Nature, 2005. 436(7051): p. 720-4.

37. Chang F, et al., Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). Int J Oncol, 2003. 22(3): p. 469-80.

38.Long GV, et al., Prognostic and Clinicopathologic Associations of Oncogenic BRAF in Metastatic Melanoma. Journal of Clinical Oncology, 2011. 29(10): p. 1239-46.